



Attorney Docket No.: BHT-31115234

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Shiao-Wen TSAI et al.

Application No.: 10/076,288

Filed: February 19, 2002

Group Art Unit: 1615

Examiner: Not Yet Assigned

For: METHOD FOR PRODUCING CROSS-LINKED HYALURONIC ACID-
PROTEIN BIO-COMPOSITES

CLAIM TO PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119

Assistant Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Pursuant to the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55, Applicant
claims the right of priority based upon **Chinese Application No. 090119567** filed
August 10, 2001.

A certified copy of Applicant's priority document is submitted herewith.

Respectfully submitted,

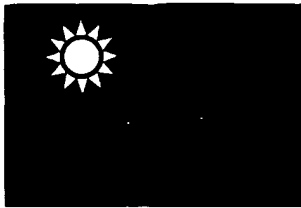
By:

Bruce H. Troxell
Reg. No. 26,592

DOUGHERTY & TROXELL
5205 Leesburg Pike, Suite 1404
Falls Church, Virginia 22041
Telephone: (703) 575-2711
Telefax: (703) 575-2707

Date: March 13, 2002

16.15
RECEIVED
MAR 15 2002
P#2



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA



RECEIVED
MAR 13 2002
TECH CENTRE 1600/2980

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛。
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2001 年 08 月 10 日
Application Date

申請案號：090119567
Application No.

10/076,288-TSRI et al.
GAR 16'S
P-T-311-224

申請人：財團法人工業技術研究院
Applicant(s)

局長
Director General

陳明邦

發文日期：西元 2001 年 9 月 12 日
Issue Date

發文字號：09011013619
Serial No.

申請日期	90. 8. 10
案 號	90119567
類 別	發明

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	交鏈型透明質酸-蛋白質生物複合材料及其製法
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	楊炯琳、陳瑞祥、蔡曉雯
	國 籍	中華民國
	住、居所	台北市東華街2段340巷2弄4號 新竹市民有二街21號 高雄縣彌陀鄉中華路6號
三、申請人	姓 名 (名稱)	財團法人工業技術研究院
	國 籍	中華民國
	住、居所 (事務所)	新竹縣竹東鎮中興路四段一九五號
	代 表 人 姓 名	翁政義

四、中文發明摘要 (發明之名稱：)

交鏈型透明質酸-蛋白質生物複合材料及其製法

本發明係有關一種製備不同型態交鏈型多醣類-蛋白質生物複合材料的新方法，在製造過程中，多醣類溶液與蛋白質溶液在適當的酸鹼值及鹽類存在下，可混合成一均勻溶液，並製備成各種型態，如薄膜狀、海棉狀、纖維狀、細管或微粒狀等，然後在含有交鏈劑之微酸有機相溶液中進行交鏈，可得到一生物相容性佳、可生物分解、並延長酵素分解時間及具有良好物性之植入式生物複合材料。

英文發明摘要 (發明之名稱：)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝
訂
線

五、發明說明（ / ）

發明領域：

本發明係關於一種製造不同型態交鏈型多醣類-蛋白質生物複合材料的方法，尤指一種經由不同比例透明質酸-蛋白質之均勻溶液，可加工成不同型態生物複合材料。

發明背景：

透明質酸（hyaluronic acid）或稱玻璃質酸、玻尿酸，為存在於脊椎動物的組織與液體的一種黏多醣，是Karl Meyer等人於1934年首先發表，由牛眼的玻璃狀液（vitreous humor）分離純化而得，含有醣醛酸及氨基糖。透明質酸為一線性高分子，分子量可由數萬至數百萬，其重複單位是由D-葡萄糖醛酸（D-glucuronic acid）及D-N-乙醯基-葡萄糖胺（D-N-acetyl-glucosamine）以 β -(1-3)鍵結所構成之雙體（dimer），再以 β -(1-4)鍵結成直鏈聚合物。在自然界中廣泛地存在於脊椎動物的結締組織、黏液組織、眼球之晶狀體，及某些細菌的莢膜中。商業上主要用於眼外科手術及化粧品，亦可用於藥劑釋放、關節炎治療劑、關節手術或一般創傷癒合上。工業生產主要由雞冠中抽取純化，亦可利用生物技術以醱酵法由鏈球菌（*Streptococci*）屬之莢膜中分離生產。

透明質酸水溶液同時表現了黏性及彈性的特質，應用於眼科的透明質酸產品通常被稱為黏彈物質。這種黏彈特性是由於透明質酸的高分子量及大分子體積（molecular volume）所形成的海棉狀高分子網路（polymeric network）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明（²）

造成。在生物體中透明質酸由位於原生質膜（plasma membrane）之透明質酸合成酶（synthetase）合成，而由位於溶菌酶（lysozyme）之透明質酸酶（hyaluronidase）分解。透明質酸與醣蛋白（proteoglycans）間的交互作用可穩定基質的結構，且在細胞的表面修飾細胞的行為。此種特性提供了許多重要的生理功能，包括：潤滑、水分的自動調節、過濾效果以及調節細胞質中蛋白質的分佈。

透明質酸因具有以下優點：自然存在於人體內、無免疫反應、可被人體分解吸收、且已可大量取得，而成為常用於醫藥方面的生物高分子。透明質酸主要用於白內障、角膜損傷等眼科外科手術，高分子量（數百萬）的透明質酸溶液注射於眼中當黏彈液，保持眼睛的正常形狀與功能；另外，透明質酸亦可用於關節炎治療劑或關節手術。近年來透明質酸也被發展在一般創傷癒合、手術後組織抗沾黏及藥劑釋放上。由於透明質酸具有保持水份的功能，因此可以應用於防止皮膚老化的化粧品上。

膠原蛋白為動物體內含量豐富的結構性蛋白質，是一種天然的生物高分子，可經由分離、純化程序，或再配合適當酵素作用（如：胃蛋白酵素），將膠原蛋白可能引起免疫反應的部分去除，得到生物組織相容性良好之膠原蛋白材料。膠原蛋白可透過各種不同型態之重組及化學交鏈技術，再配合加工程序，處理成多種型態，如平板、管子、海棉、粉末或柔軟的纖維織品，且膠原蛋白可在體內自然分解，生物相容性佳，毒性低，因此已被應用於止血材、

五、發明說明(3)

神經重建、組織整型、燒燙傷敷料、脫腸修補、尿道手術、藥物釋放、眼科、陰道避孕器、修補心瓣膜、血管壁手術及手術縫線等生醫材料上。

明膠為變性之膠原蛋白，氨基酸成份與膠原蛋白接近，但結構與膠原蛋白顯著不同，物化特性也有很大差異。目前已廣泛用於食品上，也有部分用於醫學上之研究與應用，如：止血棉、藥物釋放基質。

透明質酸與膠原蛋白為細胞間質(extracellular matrix, 簡稱ECM)的主要成分，明膠亦由膠原蛋白而來，皆具有良好的生物相容性，亦可被體內的酵素分解，因此其複合材料可應用於植入式生醫材料上，如組織工程、活性物質釋放系統或手術後組織抗沾黏之阻擋物。

Milena Rehakova等人[“Properties of collagen and hyaluronic acid composite materials and their modification by chemical crosslinking”, *Journal of biomedical materials research*, 30:369-372, 1996]以膠原蛋白與透明質酸做複合材料，並以乙二醛、澱粉二醛(starch dialdehyde)為交鏈劑。方法為將膠原蛋白打散於0.5莫耳濃度醋酸中，再加入透明質酸之水溶液，反應5分鐘，產生一纖維析出，將其過濾，並以水及乙醇清洗數次，於35°C，常溫下乾燥，形成一膜狀具平滑表面之纖維結構。將此複合材料膜浸於澱粉二醛的交鏈溶液中進行反應，但乙二醛之交鏈則在膠原蛋白懸浮液中加入透明質酸與乙二醛，或先加入乙二醛再加透明質酸，即可得不同材料。

Jin-wen Kuo等人[“Chemical Modification of Hyaluronic acid by

五、發明說明 (4)

Carbodiimides", *Bioconjugate chemistry* 2 : 232-241, 1991]使用高分子量的透明質酸鈉鹽與1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (以下簡稱: EDC), 在酸鹼值為4.75下反應。一般碳二亞胺與透明質酸鈉鹽的反應過程為: 透明質酸鈉鹽溶於水, 配成4mg/ml濃度, 而在一些反應中會加入胺(amine)與透明質酸鈉鹽混合, 此混合液之酸鹼值調至4.75, 碳二亞胺溶於水或異丙醇, 視其溶解度而定。透明質酸與碳二亞胺混合後, 以酸鹼測定儀監控, 隨時加入0.1N鹽酸, 使溶液酸鹼值維持在4.75。於室溫下進行反應二小時, 再加入鹽酸至濃度為反應溶液的5% (重量/體積), 加入此溶液體積三倍的乙醇, 產生沉澱析出。反覆2-3次, 洗去未反應之有機化學成分, 最後的析出物溶於去離子水, 再冷凍乾燥。

Lin-Shu Liu等人["An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration", *Biomaterials* 20:1097-1108, 1999]利用過碘酸鈉鹽(sodium periodate, NaIO_4)將多醣類透明質酸氧化開環, 並產生醛基, 再以此醛基與膠原蛋白交鏈形成共價鍵結, 製備可支持軟骨或骨頭修補材料。

F.Bakos等人["Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite", *Biomaterials* 20:191-195, 1999]製備了一種複合材料, 無機成分(氫氧基磷灰石, HAP)與有機成分(含92重量百分比膠原蛋白與8重量百分比的透明質酸;)的比例為9:1。氫氧基磷灰石的顆粒漸漸加入膠原蛋白與8重量百分比的透明質酸的水溶液, 然後攪拌使其混合。另將細微的膠原蛋白纖維分散

五、發明說明 (5)

至水中 (1% 依重量百分比)。將此二分散液混合，得到一沉澱之複合物，再經過濾，於37°C下乾燥，但並無交鏈過程。

C.J.Doillon等人[“Behavior of fibroblasts and epidermal cells cultured on analogues of extracellular matrix”, *Biomaterials* 9 : 91-96, 1988]利用一多孔性膠原蛋白海綿物做為支持上皮細胞以及纖維母細胞之生長，而成為一人工皮膚的基材。而透明質酸和/或纖維肌絲 (fibronectin, FN) 的存在，則促進皮膚傷口之修復及細胞的增生，這些大分子可修飾組織培養之細胞行為。製備方法為：將非水溶性膠原蛋白分散在酸鹼值3.0之鹽酸中 (1% 重量/重量)，若要加入透明質酸、纖維肌絲、硫酸皮膚素 (**Dermatan sulfate**，以下簡稱：DS) 及6-硫酸軟骨素 (**Chondroitin-6-sulfate**，以下簡稱 C6S) 等，則在此步驟加入，濃度以0.1毫克/毫升 (1%w/w至膠原蛋白) 或0.5毫克/毫升 (1%重量/重量至膠原蛋白)。將此分散液在-30°C下冷凍，經冷凍乾燥後再交鏈。

S.Srivastava等人[“In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials”, *Biomaterials* 11 : 155-161, 1990]研究細胞在改質或添加了氨基葡萄糖聚糖 (**Glucosaminoglycans**，以下簡稱GAGs) (如5%或10%之硫酸軟骨素 (**Chondroitin sulfate**，以下簡稱CS) 或低於5%之透明質酸) 的膠原蛋白基材上，有較好之貼附與生長，而透明質酸濃度若超過5%，則會抑制細胞的貼附與生長。

五、發明說明 (6)

S.Srivastava等人[“The attachment and growth of an established cell line on collagen, chemically modified collagen, and collagen composite surfaces”, *Biomaterials* 11 : 162-168, 1990]評估一已建立之纖維母細胞 (fibroblast) 細胞株在膠原蛋白或改質之膠原蛋白材料上之反應。其中膠原蛋白/GAGs與纖維肌絲複合材料之製備基本上是參考Yannas等人之作法。將去氣泡 (degassed) 之0.3%重量/體積膠原蛋白混合液 (collagen slurry) 於0.05莫耳醋酸中攪拌，邊攪拌邊滴入溶於0.05莫耳醋酸之透明質酸，直至GAGs為膠原蛋白乾重之2.5%，之後均質並去氣泡。膠原蛋白/透明質酸複合材料中含5%、10%、20% (GAGs)，而膠原蛋白/CS複合材料中含5%、10% 4-硫酸軟骨素 (**Chondroitin-4-sulfate**，以下簡稱C4S) 及C6S，製備方法相同。另可加1%纖維肌絲溶液至上述複合材料中，最後複合材料於培養皿上，做細胞培養。本實驗結果顯示，天然膠原蛋白與聚苯乙烯 (polystyrene, 培養皿材質) 相較，天然膠原蛋白較差，但化學改質或加入CS，纖維肌絲，則可改進貼附性質。又透明質酸超過5%時，對細胞的貼附與生長比天然膠原蛋白還差，有抑制效果。

M.Hanthamrongwit等人[“Chondroitin sulphate incorporated into collagen gels for the growth of human keratinocytes : the effect of cross-linking agents and diamines”, *Biomaterials* 17 : 775-780, 1996]探討了GAGs，透明質酸，C6S及交鏈劑 (二胺diamine, 碳二亞胺carbodiimide) 在膠原蛋白凝膠中對人類上皮細胞生長的影響。膠原蛋白凝膠的製備方法為：將4.29毫克毫升的膠原蛋白溶液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (7)

(collagen solution) 與10倍 DMEM (**Dulbecco's Modified Eagle Medium**，以下簡稱DMEM) 和0.4莫耳氫氧化鈉 (2:1) 之混合液，以及1:1000 (體積/體積) 醋酸以7:1:2 的比例混合，並以1莫耳氫氧化鈉調整其酸鹼值至8-8.5，於室溫下靜置2小時形成凝膠。若要加入GAGs，則將溶於1倍無血清DMEM之透明質酸或C6S溶液，以不同比例取代上述比例中2體積之醋酸。形成凝膠後，加入1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳二亞胺 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide，即EDC) 水溶液，再加入二胺 (diamine) 溶液，進行交鏈反應。

L.H.H. Olde Damink 等人[“Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide”, *Biomaterials*, 17:765-773, 1996]將處理後之膠原蛋白 (dermal sheep collagen, 以下簡稱 DSC) 秤重1克【約含1.2毫莫耳，算法為假設每一 α -鏈 (分子量約100,000) 上有120個羧基 (-COOH)】，浸於100毫升含1.15克 (6毫莫耳) EDC水溶液，於室溫反應18小時，在此期間以0.1莫耳氫氧化鈉調整維持其酸鹼值為5.5，交鏈後於0.1莫耳磷酸氫二鈉 (Dibasic sodium phosphate, Na_2HPO_4) 中清洗2小時，再以蒸餾水洗4次，最後冷凍乾燥 (簡稱E-DSC)，另一種交鏈方法為在交鏈溶液中加入與EDC等量之N-羥基琥珀醯亞胺 (**N-hydroxysuccinimide**，以下簡稱NHS)，反應4小時 (簡稱E/N-DSC)，結果E/N-DSC之交鏈效果較佳。

Yannas 等人於美國專利4060081 (1977) 中揭示一種人工皮膚多層膜的組成：內層為以醛類或脫氫加熱作用

五、發明說明（8）

（dehydrothermal）交鏈之膠原蛋白-黏多醣複合材料（約0.5重量百分比），外層則為濕氣控制層（合成或天然高分子），其中黏多醣為含硫之黏多醣（主要為CS6）。

另外，Yannas等人於美國專利4,280,954（1981）中揭示交鏈之膠原蛋白-黏多醣複合材料的製備方法：將酸鹼值約為3的膠原蛋白酸性水溶液與黏多醣類（重量比約佔6-15%）接觸，因而產生一沉澱之膠原蛋白-黏多醣類產物，以醛類化學交鏈劑共價交鏈。

Yannas等人於美國專利4,350,629（1982）中揭示於酸性（酸鹼值小於6）水溶液中之膠原蛋白纖維在與GAGs接觸前，先與交鏈劑（戊二醛）作用，所得之材料具有非常低的血栓形成。在製備膠原蛋白-GAGs複合材料的方法，其改良處為膠原蛋白浸泡於酸性水溶液時，先與交鏈劑接觸。適用於留置導管、血栓修補物，以及其它會長時間持續與血液接觸之裝置。

Yannas等人於美國專利4,448,718（1984）中揭示利用膠原蛋白和GAGs共析後過濾所得材料，經乾燥成海綿狀物，再以醛類蒸氣交鏈，使其平均分子量（Mc）介於800-60,000之間，Mc為鄰近兩處交鏈間之鏈段（segment）的平均分子量。

Balazs等人於美國專利4,582,865（1984）揭示了一種製備交鏈透明質酸膠體的方法，將透明質酸或透明質酸/親水性複合物（多醣類或蛋白質）在酸鹼值大於9，於20℃下以二乙烯砜（divinyl sulfone以下簡稱DVS）交鏈，混合物的

五、發明說明 (7)

固形份約1-8%，透明質酸佔成分的5-95%。

Liu等人於美國專利5,866,165 (1999) 揭示了一種製備可支持軟骨或骨頭修補基材的方法：利用過碘酸鈉 (NaIO_4) 將透明質酸多醣類氧化開環，並產生醛基，再以此醛基與膠原蛋白交鏈，形成共價鍵結，透明質酸：膠原蛋白由99：1至1：99（重量比）的比例混合，氧化開環比例1-50%的重複單元。

Pitaru等人於美國專利5,955,438 (1999) 揭示了一種製備GTR (**guide tissue regeneration**之簡稱) 之基材的方法：以酵素處理後之可溶性膠原蛋白做成薄膜，並以還原糖交鏈，再經臨界點乾燥。

Pierschbacher於美國專利5,955,578 (1999) 揭示一種用於傷口癒合的多胜太類聚合耦合物 (polypeptide-polymer conjugates)，將合成的含RGD (**Arg-Gly-Asp**之簡稱) 或特定氨基酸序列之多胜肽類，經由以戊二醛glutaraldehyde作為交鏈劑鍵結到生物可分解的高分子上，目的在促進細胞的貼附與遷移。

Hall等人於美國專利5,800,811 (1998) 中揭示一種製備人工皮膚的方法：將膠原蛋白基材浸透於生長因子，再與幹細胞一起培養，形成人工皮膚。

Stone等人於美國專利4,880,429 (1989) 中揭示一種修補的半月軟骨，由第一種型態之膠原蛋白纖維 (Type I collagen fibrils) 65%-98%，與不均勻散佈其間之GAGs分子 (CS-6、CS-4、DS或透明質酸，1-25%) 所構成之乾燥多孔

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明（10）

基材，孔徑大小10-50微米，適合纖維軟骨生長。

Stone等人於美國專利5,108,438（1992）中揭示利用生物相容性、可生物降解之天然高分子纖維（如：膠原蛋白）製成乾燥之多孔性基材，作為脊椎間盤的修補材料，也讓GAGs散佈在纖維間，含量約佔0-25%，交鏈劑則使用戊二醛、碳二亞胺等。

Silver等人於美國專利4,703,108（1987）中揭示一種製備生物可降解之交鏈型膠原蛋白基材的方法，以碳二亞胺與抽真空加熱的方法交鏈，可促進纖維纖維母細胞生長，膠原蛋白與透明質酸在酸鹼值3之鹽酸中混合均質後，冷凍乾燥或自然乾燥。交鏈劑使用碳二亞胺的一種氰胺（cyanamide），將基材浸於22℃，酸鹼值5.5，含1重量百分比氰胺的水溶液中24小時，超過24小時後，再冷凍乾燥。

Silver等人於美國專利4,970,298（1990）中揭示一種製備生物可降解、多孔性的以膠原蛋白為基質之類海綿複合物，特別適用於皮膚傷口。將膠原蛋白分散在酸鹼值3-4的酸液中，與酸鹼值3-4，含纖維肌絲或透明質酸之酸液混合，冷凍乾燥得海棉狀物，再經二次交鏈步驟，先以碳二亞胺交鏈，再經脫氫加熱作用（dehydrothermal），或先經脫氫加熱作用，再與碳二亞胺進行交鏈。

發明概述：

根據專利與文獻的探索分析，一般在提到多醣類與蛋白質複合材料的製備時，多為在酸性條件下，將少量之多醣類（一般小於膠原蛋白重量之15%）與蛋白質混合，藉由其

五、發明說明 (//)

離子鍵的作用，而形成一塊蛋白質纖維上附有多醣類的沉澱析出產物，再加上交鏈劑形成共價鍵結後，清洗並過濾，再經冷凍乾燥，得到一具無方向性纖維的海綿或多孔性基材。此製程缺點為只能得到具纖維結構之多孔性基材，而非混合均勻之複合材料，若要依據植入材料需求，形成不同型態，則有困難。一般是將一塊析出之沉澱產物，經均質化將纖維切成為小片段，再置入欲得形狀之盛盤冷凍乾燥。本專利所開發之技術可製備不同比例混合溶液、不同酸鹼值之均勻多醣類-蛋白質溶液，再加工成各種型態（如薄膜、海棉、纖維、細管或微粒等）後，加以有機相水溶液之化學交鏈，而得到一均勻、生物相容性佳、可生物分解、並延長酵素分解時間，且具有良好物性之植入式複合材料。

本發明之優點在於可於大範圍酸鹼值內製備多醣類-蛋白質混合均勻溶液，並非僅在酸性條件下，而多醣類與蛋白質之重量比例可由2/98至90/10，非傳統上多以膠原蛋白為主，多醣類為添加物，其所佔最大比例約20%。此外，本發明所得基材為一均勻緻密或具孔隙度，可直接將溶液依需要製成個種型態，包括：薄膜狀、海棉狀、纖維狀、細管狀或微粒狀等。當在微酸性有機相溶液中使用碳二亞胺進行化學交鏈時，可避免多醣類流失，且反應時間僅需2-4小時。以往方法則是交鏈劑多採醛類，使用碳二亞胺者，則多在水溶液相進行，且反應時間長達24小時以上。

因此，本發明所開發之技術為以往開發技術所未曾提及，

五、發明說明(1)

所具優點甚多，藉由本發明專利技術之實施，所產生不同型態之交鏈型多醣類-蛋白質生物複合材料，極適合於生物醫學、材料組織工程、醫療器材、藥學或化粧品上之應用，相當具有產業利用價值，故依法提出專利申請。

發明之詳細說明：

本發明係關於一種製造不同型態交鏈型多醣類-蛋白質生物複合材料的方法，其特徵在於經由不同比例透明質酸-蛋白質之均勻溶液，可加工成不同型態之薄膜狀、或海棉狀、或纖維狀、細管或微粒狀之多醣類材料，經化學交鏈後，可得到具有良好生物相容性、可生物分解、可有效延長酵素分解、機械強度佳、無毒性之可植入式生物複合材料，適合應用於生物醫學材料、組織工程、醫療器材或化粧品上，其用途包括：可作為止血劑、血管密封劑、整型外科移植物包覆劑、血管移植包覆劑、牙科移植物、傷口覆蓋物、抗沾黏物質、血小板分析試劑、研究試劑、人造基因工程軟骨、人工肌腱與血管神經再生、角膜移植、細胞保存培養基和生長因子與藥物傳遞之應用。藉由本發明之實施，可生產各類高附加價值之衍生產品，相當具有產業利用價值。

本發明之不同型態多醣類/蛋白質生物複合材料之製造方法，包括下列步驟：

- (a) 配製一多醣類溶液。
- (b) 配製一蛋白質溶液。

五、發明說明(13)

(c) 將步驟(a)、(b)兩者調至適當範圍之酸鹼值與鹽類含量，混合後攪拌成均勻溶液，可製成不同型態基材，依需要而製成如：薄膜、多孔性基材、海棉纖維、細管或微粒等。

(d) 將基材浸泡於適當範圍之酸鹼值，且含有化學交鏈劑之含水之有機溶劑中，選擇適當溫度反應。

(e) 選擇性地將基材以含水之有機溶劑清洗數次，浸泡於選自氯化鈉或磷酸氫二鈉或其混合物之鹽類溶液，再以去離子水清洗數次後烘乾。

上述步驟(a)之多醣類溶液，可以選用下述組群中至少一種或其混合物：透明質酸、羧甲基纖維素(Carboxy methyl cellulose)、殼聚糖(chitosan)、果膠(piection)、澱粉、褐藻酸鹽(alginate)、軟骨素-4-硫酸鹽(Chondroitin-4-sulfate)、軟骨素-6-硫酸鹽(Chondroitin-6-sulfate)、瓊脂(agar)、鹿角菜膠(carragenan)和瓜耳樹膠(Guar gum)等。

上述步驟(b)所述之蛋白質溶液，係指膠原蛋白溶液或明膠溶液或其混合物。

上述步驟(c)所述之適當範圍之酸鹼值較佳介於3-11，酸鹼值的變化則以醋酸、鹽酸、氫氧化鈉、氫氧化鉀溶液等質子酸及為可提供氫氧基之鹼，最佳為選自下列的一種或其混合物：氫氧化鈉、氫氧化鉀及其中和產生之鹽類來調整。多醣類與蛋白質溶液均勻混合後之總固形份含量0.2%-4.0%之間，其中多醣類所佔重量比在2%-98%之間，而

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(14)

鹽類濃度則因選擇質子酸及氫氧化物種類不同而介於在0.05莫耳濃度-0.25莫耳濃度之間。

上述步驟(c)所述不同型態基材，製造過程舉例說明分述如下：

- (1) 薄膜基材之製備方法為，將去除氣泡後之多醣類與蛋白質混合均勻溶液，倒入模具中，置於35°C烘箱中乾燥成膜。
- (2) 多孔性基材之製備方法為，將去除氣泡後之多醣類與蛋白質混合均勻溶液，倒入模具中，置於-80°C冰箱中冷凍，再置於冷凍乾燥機中真空乾燥，製成具多孔性結構，且為交互連通結構之孔洞基材。
- (3) 微粒基材之製備方法為，將去除氣泡後之多醣類與蛋白質混合均勻溶液，以適當大小之針頭滴入冷凍液中，置於-80°C冰箱中冷凍，再置於冷凍乾燥機中真空乾燥成微粒狀。
- (4) 纖維狀基材之製備方法為，將去除氣泡後之多醣類與蛋白質混合均勻溶液，利用押出裝置連續性擠出至含有有機溶劑之凝固液中，形成纖維狀之材料，真空乾燥後可得直徑介於1毫米-50微米之纖維狀基材。

上述使用含有有機溶劑之凝固液組成分為含水有機溶劑，其中有機溶劑可以是：二乙醚、氯仿、二氯甲烷(dichloromethane, CH_2Cl_2)、N,N-二甲基甲醯胺(N,N-dimethylformamide, DMF)、N,N-二甲基乙醯胺(N,N-dimethyl acetamide, MAc)、乙酸乙酯、或丙酮、甲乙酮等酮類溶劑；或甲醇、乙醇、丙醇、異丙醇、丁醇等

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (15)

醇類溶劑。

在凝固液中，有機溶劑之重量百分比為60%-100%，但以75%-100%為佳，且酮類與醇類溶劑，可以任意比例使用。

上述步驟（d）所使用之交鏈劑為碳二亞胺類，以碳二亞胺為佳，較佳者為選自以下其中一種或其混合物：

1-甲基-3-（3-二甲基胺基丙基）碳二亞胺【1-methyl-3-（3-dimethylaminopropyl）】carbodiimide，或3-（3-二甲基胺基丙基）-3-乙基碳二亞胺【3-（3-dimethylaminopropyl）-3-ethyl- carbodiimide】，或1-乙基-3-（3-二甲基胺基丙基）碳二亞胺【1-Ethyl-3-（3-dimethylaminopropyl）carbodiimide，即EDC】。

上述步驟（d）所使用之含水有機溶劑溶液，為含有5-50%水之乙醇或丙酮，但以5-30%較佳。混合溶液之酸鹼值則在4-5.5之間，反應溫度為20-45℃，反應時間為1小時-6小時，以2小時-4小時為佳。

上述步驟（e）所述含水有機溶劑溶液，為含有5-50%水之乙醇或丙酮，但以5-30%為佳；浸泡鹽類溶液為濃度0.15-4莫耳濃度之氯化鈉溶液或溶液磷酸氫二鈉或其混合物，浸泡時間在30分鐘至3小時之間。

茲以下列實施例進一步說明本發明，惟這些實施例僅係用於說明，本發明之範圍並不侷限於此。

以下係以較佳實施例解釋該本發明之不同型態多醣類/蛋白質生物複合材料之製造方法：

五、發明說明 (16)

實施例一：

透明質酸/膠原蛋白基材之製備：秤重60毫克透明質酸，另秤重40毫克膠原蛋白，兩者依不同條件分別溶解後混合（如表一所列），透明質酸與膠原蛋白之重量比為3：2，總固形份約1%，將混合溶液倒入鐵氟龍模具中，於烘箱乾燥成膜。成膜後之外觀與薄膜物性以1D與1E為最佳。

表一：透明質酸/膠原蛋白基材之不同製備條件

	1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G
HA ^a 溶劑	水	0.1N氫 氧化鈉	0.1 M 醋酸	水	水	水	水
膠原蛋 白溶劑	0.5 M 醋酸	0.1 M 醋酸	0.1N氫 氧化鈉	0.5 M 醋酸	於0.5 M 醋酸溶 解後，以 1N氫氧 化鈉調 整酸鹼	水以氯 化氫調 整酸鹼 值至7	0.5 M醋 酸與1N 氫氧化 鈉之混 合液
氯化鈉	-	-	-	30毫克	-	-	-
混合後 溶液	白色纖 維析出	透明 黏度低	透明	透明	透明	細小纖 維析出	白色細 纖維析 出
1N氫氧 化鈉	數滴，使 析出纖 維再溶 解	-	-	-	-	-	-
pH值	~9	~8	~7	~3	~6	~7	~6
成膜外 觀	表面有 細纖維 結構	半透明	半透明	白色緻 密	白色緻 密韌度 高	表面有 細纖	白色

註a：HA係為透明質酸之簡稱

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明(17)

實施例二：

透明質酸/明膠基材之製備：

秤重50毫克透明質酸溶於5毫升純水，另秤重50毫克明膠溶於5毫升之溫水（高於55℃）後，加入30毫克氯化鈉，兩者混合後形成一10毫升均勻溶液，此時溶液之酸鹼值約6.5，透明質酸與明膠之重量比為1：1，總固形份約1%，將此溶液倒入鐵氟龍模具中，於烘箱乾燥可得一透明薄膜。

實施例三：

不同中和鹽濃度之透明質酸/膠原蛋白基材之製備：

秤重60毫克透明質酸溶於純水，另秤重40毫克膠原蛋白於0.5莫耳醋酸溶解後，加入1N氫氧化鈉中和，改變水、醋酸、氫氧化鈉的體積比（如表二所列），並以調整中和所得鹽濃度，使酸鹼值為6，將透明質酸溶液與膠原蛋白溶液混合後形成一10毫升均勻溶液，透明質酸與膠原蛋白之重量比為3：2，總固形份約1%，將此溶液倒入鐵氟龍模具中，於烘箱乾燥製得成膜。

表二：不同中和鹽濃度之透明質酸/膠原蛋白基材之製備

	2A	2B	2C
水（毫升）	5.5	7	8.5
0.5 M醋酸	3	2	1
1N氫氧化鈉	1.5	1	0.5
中和所得鹽濃度（M）	0.15	0.1	0.05

五、發明說明(18)

實施例四：

不同酸鹼值透明質酸/膠原蛋白基材之製備：

秤重60毫克透明質酸溶於純水，另秤重40毫克膠原蛋白於0.5莫耳濃度醋酸溶解後，加入1N氫氧化鈉中和，改變水、醋酸、氫氧化鈉的體積比（如表三所列），以調整酸鹼值，中和所得鹽濃度約為0.15莫耳濃度，將透明質酸溶液與膠原蛋白溶液混合後形成一10毫升均勻溶液，透明質酸與膠原蛋白之重量比為3：2，總固形份約1%，將此溶液倒入鐵氟龍模具中，於烘箱乾燥製得成膜。

表三：不同酸鹼值透明質酸/膠原蛋白基材之製備

	3A	3B	3C
水（毫升）	3.5	5.5	5.44
0.5莫耳濃度醋酸（毫升）	5	3	3
1N氫氧化鈉（毫升）	1.5	1.5	1.56
酸鹼值	4.7	6	11

實施例五：

不同比例透明質酸/膠原蛋白質基材之製備：

秤重透明質酸溶於純水，另秤重膠原蛋白於0.5莫耳濃度醋酸溶解後，加入1N氫氧化鈉中和，水、醋酸、氫氧化鈉的體積比為3.5：5：1.5，酸鹼值為4.7，中和所得鹽濃度約為0.15莫耳濃度，將透明質酸溶液與膠原蛋白溶液混合後形成一10毫升均勻溶液，透明質酸與膠原蛋白之重量比如

五、發明說明 (19)

表四所列，總固形份約1%，將此溶液倒入鐵氟龍模具中，於烘箱乾燥製得成膜。

表四：不同比例之透明質酸/膠原蛋白基材之製備

	4A	4B	4C	4D	4E	4F
透明質酸 (毫克)	90	80	60	50	20	2
膠原蛋白 (毫克)	10	20	40	50	80	98
重量比	9 : 1	4 : 1	3 : 2	1 : 1	1 : 4	1 : 49

	4G	4H	4I	4J	4K	4L
透明質酸 (毫克)	90	80	60	50	20	2
膠原蛋白 (毫克)	10	20	40	50	80	98
重量比	9 : 1	4 : 1	3 : 2	1 : 1	1 : 4	1 : 49

實施例六：

不同固形份之透明質酸/膠原蛋白質基材之製備：

秤重透明質酸溶於純水，另秤重膠原蛋白於0.5莫耳濃度醋酸溶解後，加入1N氫氧化鈉中和，水、醋酸、氫氧化鈉的體積比為3.5 : 5 : 1.5，酸鹼值為4.7，中和所得鹽濃度為0.15莫耳濃度，將透明質酸溶液與膠原蛋白溶液混合後形成一10毫升均勻溶液，透明質酸與膠原蛋白之重量比為3 : 2，總固形份如表五所列，將此溶液倒入鐵氟龍模具中，於烘箱乾燥成膜。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (〰)

表五：不同固形份之透明質酸/膠原蛋白基材之製備

	5A	5B	5C
透明質酸 (毫克)	120	60	30
膠原蛋白 (毫克)	80	40	20
固形份 (%)	2	1	0.5

實施例 (七)：

纖維型態之透明質酸/膠原蛋白基材之製備：

秤重100毫克透明質酸溶於3.5毫升純水，另秤重100毫克膠原蛋白溶於5毫升之0.5莫耳濃度醋酸後，加入1.5毫升1N氫氧化鈉中和，中和所得鹽濃度為0.15莫耳濃度，將透明質酸溶液與膠原蛋白溶液混合後形成一均勻溶液，此時溶液之酸鹼值約4.7，透明質酸與膠原蛋白之重量比為1：1，總固形份約2%，將此溶液以不同大小注射針頭於95%乙醇中擠壓成單纖維 (monofilament fiber)，再取出於乾燥器內乾燥，得透明質酸-蛋白質材料。

實施例八：

微粒型態之透明質酸/膠原蛋白基材製備：

秤重100毫克透明質酸溶於3.5毫升純水，另秤重100毫克膠原蛋白溶於5毫升之0.5莫耳濃度醋酸後，加入1.5毫升1N氫氧化鈉中和，中和所得鹽濃度為0.15莫耳濃度，將透明質酸溶液與膠原蛋白溶液混合後形成一10毫升均勻溶液，此時溶液之酸鹼值約4.7，透明質酸與膠原蛋白之重量比為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (✓)

1:1, 總固形份約2%, 將此溶液以針筒緩慢滴入液態氮中, 經冷凍乾燥, 形成微粒。

實施例九：

多孔隙海綿型態之透明質酸/膠原蛋白基材製備：

秤重100毫克透明質酸溶於3.5毫升純水，另秤重100毫克膠原蛋白溶於5毫升之0.5莫耳濃度醋酸後，加入1.5毫升1N氫氧化鈉中和，中和所得鹽濃度為0.15莫耳濃度，將透明質酸溶液與膠原蛋白溶液混合後形成一10毫升均勻溶液，此時溶液之酸鹼值約4.7，透明質酸與膠原蛋白之重量比為1:1，總固形份約2%，將此溶液倒入鐵氟龍模具中，於-80℃冷凍後，經冷凍乾燥形成多孔隙海綿型態。

實施例十：

透明質酸/膠原蛋白基材之化學交鏈（交鏈劑溶劑之影響）：

將實施例編號5A之薄膜裁成等份，浸於含有EDC（實驗條件如表六所列），於30℃反應2小時後取出，以80%丙酮清洗3次，每次20分鐘，接著浸於1莫耳濃度氯化鈉溶液中20分鐘，再以純水清洗3次，每次20分鐘，最後攤平烘乾。將交鏈後之薄膜置入0.15莫耳氯化鈉溶液中進行膨潤試驗（swelling test），於37℃下搖晃，5天後觀察膨潤情形。由結果顯示，基材之交鏈必須在含交鏈劑之有機溶劑與水的混合液中進行（如6D、6E），以避免基材溶解與交鏈程度不足。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(22)

表六：交鏈劑溶劑之影響

	6A	6B	6C	6D	6E
EDC濃度 (wt%)	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
溶劑	水	酸鹼值4.7 水溶液	酸鹼值4.8 水溶液	80%乙醇	80%丙酮
外觀	變薄	變薄	變薄	正常	正常
溶解試驗	溶解	溶解	溶解	不溶	不溶

實施例十一：

透明質酸/膠原蛋白基材之化學交鏈（交鏈劑濃度之影響）：

將實例編號5A之薄膜裁成等份，浸於酸鹼值4.7，含有EDC之80%丙酮中（實驗條件如表七所列），於30℃反應2小時後取出，以80%丙酮清洗3次，每次20分鐘，接著浸於1莫耳濃度氯化鈉溶液中20分鐘，再以純水清洗3次，每次20分鐘，最後攤平烘乾。將交鏈後之薄膜置入0.15莫耳濃度氯化鈉溶液中進行膨潤試驗（swelling test），於37℃下搖晃，5天後觀察膨潤情形。而將交鏈薄膜分別秤重後，置入含220U透明質酸酶（Hyaluronidase/ml）的0.15莫耳濃度氯化鈉溶液中進行酵素分解（enzyme degradation），24小時後收集溶液作醣醛酸分析（uronic acid assay），計算後得酵素分解出之透明質酸佔薄膜中透明質酸總量之百分比。結果顯示，經此種交鏈製程基材之酵素分解速率可明顯降低。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(23)

表七：交鏈劑濃度之影響

	7A	7B	7C	7D	對照組
EDC濃度(重量百分比)	0.625	1.25	2.5	5	-
溶解試驗	不溶	不溶	不溶	不溶	溶解
透明質酸分解酵素(%)	1.87	1.5	0.68	1.02	31.13

其中對照組為透明質酸溶液調酸鹼值至4.7，加入與透明質酸莫耳比2：1之EDC於30℃反應2小時。

實施例十二：

多孔隙海綿型態之透明質酸/膠原蛋白基材之化學交鏈：

將實例(九)之多孔隙海綿置於烘箱抽真空，110℃下物理交鏈3小時，之後浸於80%丙酮中約0.5小時，再移至酸鹼值4.7，含有2.5%EDC之80%丙酮中，於30℃反應2小時後取出，以80%丙酮清洗3次，每次20分鐘，接著浸於1莫耳氯化鈉溶液中20分鐘，再以純水清洗3次，每次20分鐘，最後攤平烘乾。

實施例十四：

交鏈之透明質酸/膠原蛋白基材之細胞生長與細胞毒性：

將編號4C,4D,4E之薄膜浸於酸鹼值4.7，含有2.5%EDC之80%丙酮中，於30℃反應2小時後取出，以80%丙酮清洗3次，每次20分鐘，接著浸於1莫耳濃度氯化鈉溶液中20分

五、發明說明 (24)

鐘，再以純水清洗3次，每次20分鐘，最後攤平烘乾。交鏈之薄膜打片後置於48孔洞之培養皿中，分別將老鼠3T3纖維母細胞 (immortalized mouse 3T3 fibroblast) 與人類纖維母細胞 (human fibroblast) 種植於材料上，觀察細胞生長情形 (如表八、九)。由細胞種植實驗結果顯示，細胞於基材上持續增生，且以中性紅染劑染色觀察，均為活細胞，因此基材並無毒性，又比較人類與老鼠細胞之生長情形，並無顯著差異。

表八：老鼠 3T3 纖維母細胞貼附生長情形

($\times 10^4$ 細胞數目/毫升)

	種植細胞數	第一天	第二天	第三天
交鏈之4C	4	1.8	2.4	4.8
交鏈之4D	4	2.4	4.2	7.4
交鏈之4E	4	1.4	1.8	3.4

表九：人類纖維母細胞貼附生長情形

($\times 10^4$ 細胞數目/毫升)

	種植細胞數	第一天	第二天	第三天
交鏈之4C	4	1.2	2.2	5.0
交鏈之4D	4	2.6	4.4	7.4
交鏈之4E	4	1.6	2.4	4.0

五、發明說明 (✓)

當然，以上所述僅為本發明之較佳實施例，並非用以限制本發明之實施範圍，任何熟習該項技藝者在不違背本發明之精神所做之修改，均應屬於本發明之範圍，因此本發明之保護範圍當以下列所述之申請專利範圍做為依據。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

- 1.一種交鏈型多醣類-蛋白質生物複合材料之製造方法，係包括下列步驟：
 - (a) 配製一多醣類溶液及一蛋白質溶液之混合液，其中多醣類與蛋白質之重量比為20/80~80/20；
 - (b) 以質子酸和氫氧化物調整酸鹼值介於3~11；
 - (c) 於含有交鏈劑的之含水有機溶劑進行交鏈反應。
- 2.如申請專利範圍第1項所述之製造方法，其中該步驟(a)所述多醣類溶液係指下列其中一種或其混合物：透明質酸、羧甲基纖維素(Carboxy methyl cellulose)、果膠(piection)、澱粉、軟骨素-4-硫酸鹽(Chondroitin-4-sulfate)、軟骨素-6-硫酸鹽(Chondroitin-6-sulfate)、褐藻酸鹽(alginate)、殼聚糖(chitosan)、瓊脂(agar)、鹿角菜膠(carragenan)及瓜耳樹膠(Guar gum)。
- 3.如申請專利範圍第1項之製造方法，其中該步驟(a)所述蛋白質溶液中之蛋白質係為膠原蛋白或明膠或其混合物。
- 4.如申請專利範圍第1項所述之製造方法，其中(b)之質子酸可選自下列的一種或其混合物：醋酸、氯化氫。
- 5.如申請專利範圍第1項所述之製造方法，其中(b)之氫氧化化合物，係為可提供氫氧基之鹼，最佳為選自下列的一種或其混合物：氫氧化鈉、氫氧化鉀。
- 6.如申請專利範圍第1項所述之製造方法，其中該當多醣類

六、申請專利範圍

溶液為多醣類之水溶液，蛋白質係為膠原蛋白為溶於酸鹼值約3之溶液。

- 7.如申請專利範圍第1項所述之製造方法，其中該當多醣類溶液為溶於酸之溶液，蛋白質係為膠原蛋白為溶於鹼之溶液，二者混合後之酸鹼值介於5-11。
- 8.如申請專利範圍第1項所述之製造方法，其中當多醣類溶液為多醣類溶於鹼之溶液，蛋白質係為膠原蛋白為溶於酸之溶液，兩溶液混合後酸鹼值介於5-11。
- 9.如申請專利範圍第1項所述之製造方法，其中該當多醣類溶液為多醣類溶於去離子水之溶液，蛋白質係為明膠為溶於去離子水，並以氯化鈉調整至適當之離子強度。
- 10.如申請專利範圍第1項所述之製造方法，其中該步驟(b)可依需要將以質子酸和氫氧化物調整酸鹼值之混溶液，經去除氣泡後，塗佈成膜，或倒入膜具冷凍乾燥成多孔材料，或乳化成微粒，或利用押出裝置，製成纖維等不同型態。
- 11.如申請專利範圍第10項所述之之製造方法，其中該膜的製備方法為將去除氣泡後之多醣類與蛋白質混合均勻溶液，倒入模具中，置於20-45℃烘箱中乾燥成膜。
- 12.如申請專利範圍第10項所述之製造方法，其中該多孔材料的製備方法，為將去除氣泡後之多醣類與蛋白質混合均勻溶液，倒入模具中，置於-30~-100℃冰箱中冷凍，再置於冷凍乾燥機中真空乾燥成具多孔結構，且孔洞型態為交互連通結構之基材。

六、申請專利範圍

- 13.如申請專利範圍第10項所述之製造方法，其中該微粒的製備方法，為將去除氣泡後之多醣類與蛋白質混合均勻溶液，以適當大小之針頭滴入冷凍液中，置於-30~-100℃冰箱中冷凍，再置於冷凍乾燥機中真空乾燥成微粒。
- 14.如申請專利範圍第10項所述之製造方法，其中該纖維的製備方法，為利用押出裝置，將去除氣泡後之多醣類與蛋白質混合均勻溶液，利用押出裝置，連續性擠出至含有機溶劑之凝固液中，形成纖維狀之材料，乾燥後為直徑介於1毫米-50微米之纖維狀透明質酸複合材料。
- 15.如申請專利範圍第14項所述之製造方法，其中該含有機溶劑之凝固液組成分為：水及有機溶劑所構成，該有機溶劑可單一或複數種類混合之：二乙醚、氯仿、二氯甲烷、N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺、乙酸乙酯、選自C1~C4之低烷酮類或選自C1~C4之低烷醇類；於凝固液中有機溶劑之重量百分率佔有60%-100%。
- 16.如申請專利範圍第15項所述之製造方法，其中酮類與醇類溶劑可以任意比例使用，而有機溶劑之重量百分率為75%-100%。
- 17.如申請專利範圍第1項所述之製造方法，其中該步驟(c)所述之交鏈劑為碳二亞胺(carbodiimide)。
- 18.如申請專利範圍第17項所述之製造方法，其中該碳二亞胺係為：1-甲基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺，或3-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺，或其混合物。
- 19.如申請專利範圍第18項所述之製造方法，其中該步驟(c)

六、申請專利範圍

所述之交鏈反應係以有機溶劑與水的混合液，其為含有5-50%水的乙醇或丙酮；調整此混合溶液之酸鹼值至4-5.5，碳二亞胺的重量百分比為0.5-25%；反應溫度為20-45°C，反應時間為1小時-6小時。

20. 如申請專利範圍第19項所述之製造方法，其中該有機溶劑與水的混合液為含有5-30%水的乙醇或丙酮；調整此混合溶液之酸鹼值至4-5.5，碳二亞胺的重量百分比為1-5%；反應時間為2小時-4小時。
21. 如申請專利範圍第1項所述之製造方法，其中(C)經交鏈反應後，可額外經使用有機溶劑與水的混合液清洗，而經鹽類溶液浸泡之後，以水清洗烘乾。
22. 如申請專利範圍第21項所述之製造方法，其中所述之有機溶劑與水的混合液為含有5-50%水的乙醇或丙酮，浸泡時間為0.5小時至3小時。
23. 如申請專利範圍第22項所述之製造方法，其中該有機溶劑與水的混合液為含有5-30%水的乙醇或丙酮。
24. 如申請專利範圍第21項所述之製造方法，其中所述之鹽類溶液為氯化鈉容液或溶液磷酸氫二鈉(dibasic sodium phosphate, Na_2HPO_4)或其混合物，濃度為0.15-4莫耳濃度。